

#2

PCT/JP03/08418

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 7月 4日

出願番号  
Application Number: 特願2002-196177  
[ST. 10/C]: [JP2002-196177]

REC'D 22 AUG 2003	
WIPO	PCT

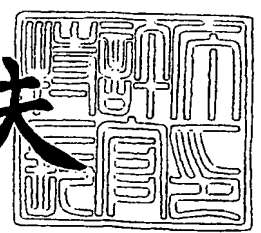
出願人  
Applicant(s): 早出 広司

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PSD-0016

【提出日】 平成14年 7月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 東京都目黒区南 1 - 1 3 - 1 6

【氏名】 早出 広司

【特許出願人】

【識別番号】 596153357

【氏名又は名称】 早出 広司

【代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100106840

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 耕司

【電話番号】 03-5521-1530

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 112462

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 2】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の第 186 残基から第 206 残基の領域または他の種における同等の領域において 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 3】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 192 番目のグルタミン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 4】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 3 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 5】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基がアラニンまたはグリシン残基で置換されている、請求項 4 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 6】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 193 番目のロイシン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 7】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 193 番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 6 記載の改変型グルコース脱

水素酵素。

【請求項 8】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 193 番目のロイシン残基がアラニンまたはグリシン残基で置換されている、請求項 7 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 9】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列

Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)

を含むことを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 10】 Xaa1がAlaまたはGlyであり、Xaa2がAlaまたはGlyである、請求項 9 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 11】 請求項 1-10 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 13】 請求項 11 に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項 14】 請求項 11 に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項 13 記載の形質転換体。

【請求項 15】 請求項 1-10 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項 16】 請求項 1-10 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (PQQ GDH) の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) あるいはグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD (P) を添加しなければならない。

#### 【0003】

そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

#### 【0004】

PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。例えば、AM. Cleton-Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315を参照されたい。一方、水溶性PQQGDHはAcinetobacter calcoaceticus のいくつかの株においてその存在が確認されており (Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217 : 430-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのホモダイマーである。他のPQQ酵素とは蛋白質の一次構造上でのホモロジーがほとんどない。

#### 【0005】

最近、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHのX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとな

った。(A.Oubrie et al., J. Mol. Biol., 289, 319-333(1999); A. Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999); A. Oubrie et al. PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999))。これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成される $\beta$ プロペラ蛋白質であることが明かとなった。

#### 【0006】

PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながらPQQGDHはグルコースに対する選択性が低いことが問題であった。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

したがって本発明は、グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は水溶性PQQGDHを遺伝子工学的に改良してそのグルコースに対する選択性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する選択性が高い酵素を得ることに成功した。

#### 【0009】

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して高い選択性を有する

。好ましくは本発明の改変型 P Q Q G D H は、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。より好ましくは、グルコースに対する反応性を 100% とした場合、ラクトースあるいはマルトースに対する活性が 50% 以下であり、より好ましくは 40% 以下であり、さらに好ましくは 30% 以下である。

#### 【0010】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の第 186 残基から第 206 残基の領域または他の種における同等の領域において 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基（すなわち天然に存在する P Q Q グルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基）で置換されている。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを 1 として番号付けする。

#### 【0011】

本明細書においてアミノ酸残基の位置または領域に関して用いる場合、「同等の」との用語は、構造上類似するが同一ではない 2 以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の生物学的または生化学的機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性 P Q Q G D H において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の第 186 残基から 206 残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考えられる場合、該領域は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の第 186 残基から 206 残基の領域と同等の領域」と言われる。さらに、該領域の第 7 番目のアミノ酸残基は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の第 192 残基と同等の位置のアミノ酸残基」と言われる。

#### 【0012】

好ましくは、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の 192 番目のグルタミン残基もしくは 193

番目のロイシン残基、または他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。

#### 【0013】

さらに好ましくは、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニンまたはグリシン残基で置換されているか、または193番目のロイシン残基がアラニンまたはグリシン残基で置換されている。

#### 【0014】

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：  
Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)を含む。好ましくはXaa1はAlaまたはGlyであり、Xaa2はAlaまたはGlyである。

#### 【0015】

本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

#### 【0016】

本発明の改変型グルコース脱水素酵素の酵素蛋白質はグルコースに対して高い選択性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高選択的かつ高感度の測定に応用することができる。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

##### 改変型PQQGDHの構造

#### 【0018】

本発明の好ましい改変型グルコース脱水素酵素においては、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他の



アミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の改変型 P Q Q G D H は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基がアラニンまたはグリシン残基で置換されているか、または 193 番目のロイシン残基がアラニンまたはグリシン残基で置換されている。

#### 【0019】

また別の観点においては、本発明の改変型 P Q Q G D H は、配列：

Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1 が Gln であるとき Xaa2 は Leu ではない)

を含む。好ましくは Xaa1 は Ala または Gly であり、Xaa2 は Ala または Gly である。

#### 【0020】

##### 改変型 P Q Q G D H の製造方法

*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の天然の水溶性 P Q Q G D H をコードする遺伝子の配列は配列番号 2 で規定される。本発明の改変型 P Q Q G D H をコードする遺伝子は、天然の水溶性 P Q Q G D H をコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列を、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載されている。

#### 【0021】

このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

#### 【0022】

本発明の改変型 P Q Q G D H においては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されてい

もよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野においてよく知られている。

#### 【0023】

さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域にと同等の領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、この領域中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコース選択性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

#### 【0024】

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

#### 【0025】

##### 酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

## 【0026】

グルコースに対する選択性

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オ-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

## 【0027】

本発明の改変型PQQGDHは野生型酵素と比較して、グルコースに対する選択性が向上しており、特にマルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する反応性が高い。したがって、本改変型酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーはグルコース測定に関して選択性が高く、種々の糖が存在する試料においても高感度でグルコースが検出できるという利点を有する。

## 【0028】

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メデイエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

## 【0029】

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる

方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型 PQQGDH はホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQ を別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型 PQQGDH をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロックする。

#### 【0030】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQ および  $\text{CaCl}_2$ 、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型 PQQGDH を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えば  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

#### 【0031】

##### 【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0032】

##### 実施例 1

##### 改変型酵素 PQQGDH 遺伝子の構築

配列番号 2 に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 PQQGDH の構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミド pGB2 は、ベクター pTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、*Acinetob*

*acter calcoaceticus* 由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである(図1)。常法に従って部位特異的変異法により192番目のグルタミン残基または193番目のロイシン残基をコードする塩基配列を、それぞれアラニン残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。さらに、167番目のアスパラギン酸残基または452番目のアスパラギン残基をコードする塩基配列を、それぞれグルタミン酸残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表1に示す。2カ所の変異を有する変異体を作成するためには、2種類のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを同時に用いて上記と同様に変異を導入した。

【表1】

Gln192Ala	5'- ata agc aag cgg gtt acg ccc -3'
Gln192Gly	5'- caa ata agc aag ccc gtt acg ccc aac -3'
Leu193Ala	5'- caa ata agc agc ctg gtt acg -3'
Leu193Gly	5'- gaa caa ata agc acc ctg gtt acg ccc -3'
Asp167Glu	5'- cc tga ctg atg ttc ttt tga tga agg -3'
Asn452Thr	5'- c atc ttt ttg gac agt tcc ggc agt at -3'

## 【0033】

ベクタープラスミドpKF18k(宝酒造(株))に*Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート50fmolと宝酒造(株)製Mutan(登録商標)-Express Kmキットに付属のセレクションプライマー5pmol、リン酸化したターゲットプライマー50pmolを全体(20 $\mu$ l)の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3 $\mu$ lの同キットエクステンションバッファー、1 $\mu$ lのT4 DNAリガーゼ、1 $\mu$ lのT4 DNAポリメラーゼおよび

5  $\mu$ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である E. coli BMH 71-18 mutS に形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

#### 【0034】

次に、ここから抽出したプラスミドを E. coli MV 1184 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド pGB 2 上の野生型 PQQGDH をコードする遺伝子の Kpn I-Hind III 断片と入れ替え、改変型 PQQGDH の遺伝子を構築した。

#### 【0035】

##### 実施例 2

##### 改変型酵素の調製

野生型または改変型 PQQGDH をコードする遺伝子を、E. coli 用の発現ベクターである pTrc 99A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを E. coli DH 5  $\alpha$  株に形質転換した。これを 450 ml の L 培地 (アンピシリン 50  $\mu$ g/ml、クロラムフェニコール 30  $\mu$ g/ml 含有) で坂口フラスコを用いて 37℃ で一晚振とう培養し、1 mM CaCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ M PQQ を含む 7 l の L 培地に植菌した。培養開始後約 3 時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0.3 mM になるように添加し、その後 1.5 時間培養した。培養液から遠心分離 (5000  $\times$  g、10 分、4℃) で菌体を回収し、この菌体を 0.85% NaCl 溶液で 2 回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離 (10000  $\times$  g、15 分、4℃) で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離 (160500  $\times$  g (40000 r.p.m.)、90 分、4℃) し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

#### 【0036】

##### 実施例 3

##### 酵素活性の測定

実施例 2 で得られた野生型および各改変型 PQQGDH の粗精製酵素標品をそ

れぞれ1  $\mu$ MPQQ、1mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187  $\mu$ lずつ分注し、3  $\mu$ lの活性試薬（6mMDCIP 48  $\mu$ l, 600mMPMS 8  $\mu$ l, 10mMリン酸緩衝液pH7.0 16  $\mu$ l）および各濃度のD-グルコース溶液10  $\mu$ lを加え、酵素活性を測定した。

### 【0037】

酵素活性の測定は、室温において、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）中においてPMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1  $\mu$ molのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3  $\text{mM}^{-1}$ とした。

### 【0038】

基質濃度対酵素活性のプロットから、 $K_m$ を求めた。結果を表2に示す。

【表2】

	グルコースに対する $K_m$ 値(mM)	$V_{\max}$ (U/mg)
野生型	30	129
Gln192Ala	50	123
Gln192Gly	36	94
Leu193Gly	177	42
Leu193Gly	157	46

### 【0039】

#### 実施例4

#### 基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例2で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1  $\mu$ MPQQ、1mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187  $\mu$ lずつ分注し、3  $\mu$ lの活性試薬（6mM DCIP, 600mM PMS, 10mMリン酸緩衝液pH7.0を含む）および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度20mMまたは100mMとなるように400mMのグルコースまたは他の

糖を加え、室温で30分間インキュベートして、実施例3と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100%とし、これに対する相対活性で表した。基質濃度20mMおよび100mMの場合の結果を、それぞれ表3および4に示す。また、二重変異を有する本発明の改変型酵素を用いて、基質濃度20mMで測定した結果を表5に示す。本発明の改変型酵素はいずれも、マルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する高い反応性を示した。

## 【0040】

【表3】

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	45	29	34	50	39
3-O-m- グルコース	82	80	101	66	60
ガラクトース	8	10	12	34	26
マルトース	49	20	24	39	30
ラクトース	53	56	40	64	56
セロビオース	85	138	85	84	71

## 【0041】

【表4】

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	62	41	45	47	35
3-O-m- グルコース	92	93	98	86	59
ガラクトース	8	6	19	25	17
マルトース	51	56	44	50	46
ラクトース	51	56	44	50	46
セロビオース	42	73	59	59	39

## 【0042】



【表 5】

	Asp167Glu/ Asn452Thr	Gln192Gly/ Asn452Thr
グルコース	100(%)	100(%)
アロース	2	32
3-O-m-グルコース	4	98
ガラクトース	2	14
マルトース	12	46
ラクトース	2	21

【0043】

実施例 5

## 基質濃度依存性

本発明の改変型 P Q Q G D H の活性の基質濃度依存性を調べた。各改変型酵素を、 $1\ \mu\text{M}$  P Q Q、 $1\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$  存在下で 1 時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび  $5\ \mu\text{M}$  P Q Q、 $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$  存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例 3 に記載の酵素活性の測定法に準じ、D C I P の  $600\ \text{nm}$  の吸光度の変化を指標とした。結果を図 3 に示す。本発明の改変型 P Q Q G D H は、野生型と比較して高いグルコース濃度において飽和する。また、いずれもグルコース濃度  $200\ \text{mM}$  まで基質阻害が見られず、 $K_{\text{Si}}$  は  $200\ \text{mM}$  以上であった。

【0044】

実施例 6

## 酵素センサーの作製および評価

5 ユニットの Gln192Ala 改変型酵素にカーボンペースト  $20\ \text{mg}$  を加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約  $40\ \text{mg}$  充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を 1 % のグルタルアルデヒドを含む  $10\ \text{mM}$  M O P S 緩衝液 (p H 7. 0) 中で室温で 30 分間処理した後、 $20\ \text{mM}$  リジンを含む  $10\ \text{mM}$  M O P S 緩衝液 (p H 7. 0) 中で室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を  $10\ \text{mM}$  M O P S 緩衝液 (p H 7. 0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は  $4\ ^\circ\text{C}$  で保存した。

## 【0045】

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、0.1mM-5mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

## 【0046】

## 【配列表】

## Sequence Listing

&lt;110&gt; Sode, Koji

&lt;120&gt; Glucose Dehydrogenase

&lt;130&gt; psg0016

&lt;160&gt; 9

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 454

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Acinetobacter calcoaceticus

&lt;400&gt; 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

1

5

10

15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20

25

30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35

40

45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50

55

60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65

70

75

80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

85

90

95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100	105	110	
Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu			
115	120	125	
Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His			
130	135	140	
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr			
145	150	155	160
Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn			
165	170	175	
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr			
180	185	190	
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile			
195	200	205	
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr			
210	215	220	
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys			
225	230	235	240
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu			
245	250	255	
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys			
260	265	270	
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys			
275	280	285	
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val			
290	295	300	
Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro			
305	310	315	320
Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro			
325	330	335	

Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser  
 340 345 350  
 Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu  
 355 360 365  
 Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile  
 370 375 380  
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met  
 385 390 395 400  
 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly  
 405 410 415  
 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp  
 420 425 430  
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys  
 435 440 445  
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys  
 450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60  
 cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaacccttta ttagagggtt aaaaattctc 120  
 ggaaaatttt gacaatttat aagggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180  
 tttattaagc gctgttcagc tagttacact ctcagcattt gctgatgttc ctctaactcc 240  
 atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagttattc tatctaattc 300  
 aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360  
 aacaggtaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420  
 accagagatt gtcaatgatg ctgatgggca gaatggttta ttaggttttg ctttccatcc 480

tgattttaaa aataatcctt atatctatat ttcaggtaca tttaaaaatc cgaaatctac 540  
agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcgttat acctataata aatcaacaga 600  
tacgctcgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660  
aggtcgtctt gtcattgggc cagatcaaaa gatttattat acgattgggtg accaagggcg 720  
taaccagctt gcttatttgt tcttgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780  
actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840  
aagtattcca aaggataatc caagttttaa cgggggtggtt agccatattt atacacttgg 900  
acatcgtaat ccgcagggct tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960  
aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atgggtggcc 1020  
gaatgtagca ggttataaag atgatagtgg ctatgcttat gcaaattatt cagcagcagc 1080  
caataagtca attaaggatt tagctcaaaa tggagtaaaa gtagccgcag gggtcctgt 1140  
gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200  
cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260  
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320  
ttgggaaaat acattatttg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380  
agatccaact tatagcacta cttatgatga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440  
ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500  
cggaaatgtc caaaaagatg atggctcagt aacaaatata ttagaaaacc caggatctct 1560  
cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 5

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Gly Arg Asn Xaa Xaa Ala Tyr Leu

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

ataagcaagc gggttacgc cc 22

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

caaataagca agcccgttac gcccaac 27

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 6

caaataagca gcctgggttac g 21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 7

gaacaaataa gcaccctggt tacgccc 27

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 8

cctgactgat gttcttttga tgaagg 26

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

catctttttg gacagttccg gcagtat 27

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成するために用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

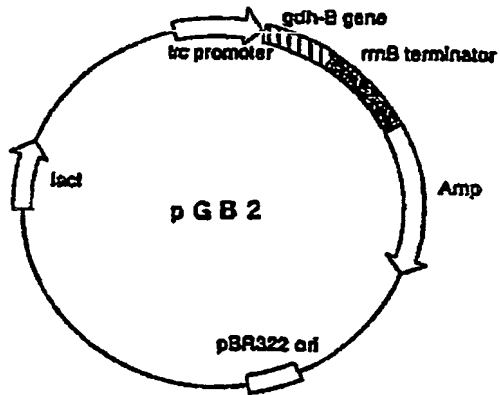
【図2】 図2は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

【図3】 図3は、本発明の改変型PQQGDHの活性の基質濃度依存性を示すグラフである。

【書類名】

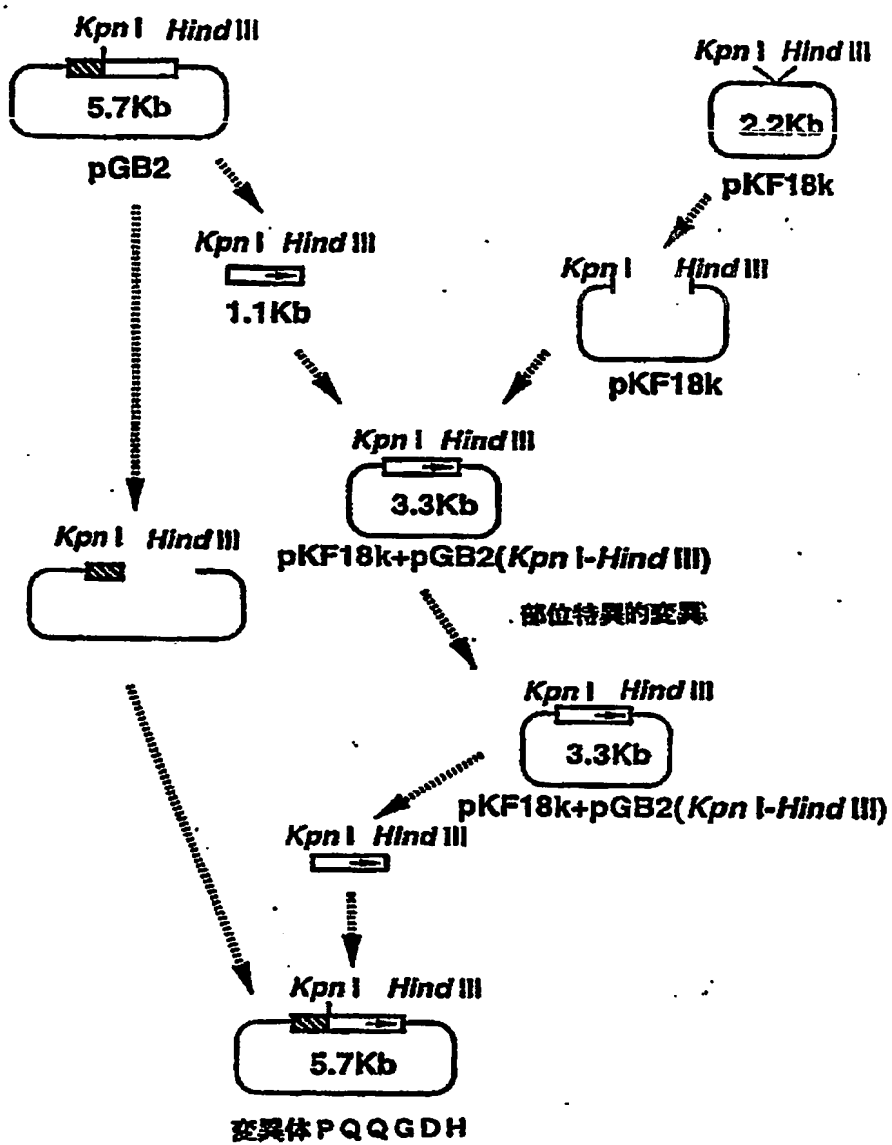
図面

【図 1】

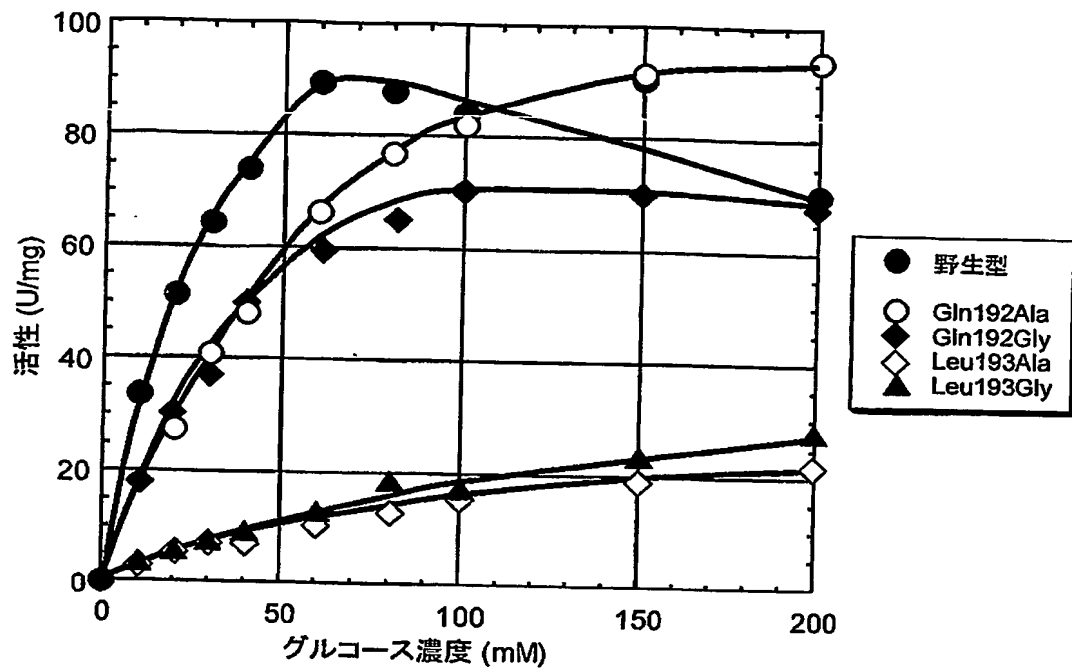




【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性 PQQGDH を提供すること。

【解決手段】 本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の第 186 残基から第 206 残基の領域または他の種における同等の領域において 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【選択図】 なし

特願2002-196177

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日

1996年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区南1-13-16

氏 名

早出 広司